

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-287544

(43)Date of publication of application : 27.10.1998

(51)Int.Cl.

A61K 7/48
A61K 7/00
A61K 31/35
// A61K 35/78

(21)Application number : 09-108353

(71)Applicant : YAKULT HONSHA CO LTD

(22)Date of filing : 11.04.1997

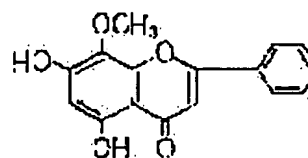
(72)Inventor : MIYAZAKI KOJI
NISHIDA YUMIKO
SHIRAISHI TATSUTOSHI
ICHIOKA MINORU
OWAKI MAKOTO

(54) ANTI-PIGMENTATION AGENT, AND SKIN COSMETIC AND PREPARATION FOR EXTERNAL USE FOR SKIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an anti-pigmentation agent excellent in stability, safety, melanogenesis-suppressive action, etc., by including wogonin as an active ingredient.

SOLUTION: This anti-pigmentation agent has tyrosinase inhibitory action, dendrite formation suppressive action and melanogenesis-suppressive action, and is obtained by including wogonin expressed by the formula as an active ingredient, as necessary, in combination with a carrier (e.g. alcohol, etc.). The wogonin is a flavonol contained in a herbal medicine, Scutellariae Radix and obtained, e.g. by subjecting the herbal medicine Scutellariae Radix to extraction with an organic solvent, removing solid materials for the extract by filtration or centrifugation, and purifying the resultant extract by means of chromatography, etc. To obtain the skin cosmetic and the preparation for external use for skin, each incorporated with the anti-pigmentation agent and having skin-whitening action, the agent is preferably included at 0.0001-50 wt.% in terms of wogonin.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-287544

(43)公開日 平成10年(1998)10月27日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 K 7/48
7/00

A 6 1 K 7/48
7/00

X
D
K

31/35

A D A

31/35

A D A

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平9-108353

(22)出願日

平成9年(1997)4月11日

(71)出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72)発明者 宮▲崎▼ 幸司

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会
社ヤクルト本社内

(72)発明者 西田 由美子

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会
社ヤクルト本社内

(72)発明者 白石 達敏

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会
社ヤクルト本社内

(74)代理人 弁理士 小野 信夫

最終頁に続く

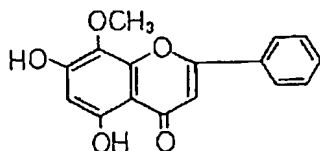
(54)【発明の名称】 色素沈着防止剤並びに皮膚化粧品および皮膚外用剤

(57)【要約】

【課題】 従来提供されたものに比べ、よりすぐれたメラニン生成抑制作用や樹状突起形成抑制作用を有し、しかも安定性、安全性の優れた色素沈着防止剤を提供すること。

【解決手段】 次の式(1)

【化1】

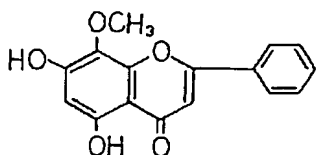


で表されるオウゴンinを有効成分として含有し、この化合物の有するチロシナーゼ阻害作用、樹状突起形成抑制作用もしくはメラニン生成抑制作用を利用する色素沈着防止剤並びにこれを配合する皮膚化粧品および皮膚外用剤。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次の式 (I)

【化 1】



で表されるオウゴンinを有効成分として含有することを特徴とする色素沈着防止剤。

【請求項 2】 チロシナーゼ阻害作用、樹状突起形成抑制作用もしくはメラニン生成抑制作用によるものである請求項第 1 項記載の色素沈着防止剤。

【請求項 3】 請求項第 1 項または第 2 項記載の色素沈着防止剤を含有することを特徴とする皮膚化粧料。

【請求項 4】 美白化粧料である請求項第 3 項記載の皮膚化粧料。

【請求項 5】 請求項第 1 項または第 2 項記載の色素沈着防止剤を含有することを特徴とする皮膚化粧料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトの表皮におけるチロシナーゼを阻害し、メラニン細胞の樹状突起形成およびメラニン生成を抑制することにより皮膚の黒化を防止する、色素沈着防止剤並びにこれを含有する皮膚化粧料および皮膚外用剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】しみ、そばかすおよび日焼け後の皮膚の色素沈着は、加齢に伴いその発生が増加し、また、消失しにくくなるため、中高年齢者では大きな悩みである。

これら色素沈着症の詳細な発症機構は、未だ明確にされていないが、日光からの紫外線の刺激、ホルモン分泌の異常、遺伝的素因が原因で色素細胞（メラニン細胞）が活性化され、メラニン色素が過剰に合成されることで生じるものと考えられている。メラニン色素は表皮の基底層に存在するメラニン細胞中でアミノ酸のチロシンからチロシナーゼの作用で合成される。合成されたメラニン色素は、メラニン細胞の樹状突起を介して隣接した表皮細胞に渡され、表皮細胞の角化と共に皮膚が黒化すると考えられている。

【0003】従来、チロシナーゼの活性を阻害する物質を用い、メラニン細胞中でのチロシンからのメラニン生成を抑制し皮膚の黒化を防止する試みがなされていた。

そして、その結果、ビタミンC、グルタチオン、アルブチン、コウジ酸、ハイドロキノン、種々の植物抽出物や胎盤抽出物等、天然物からの抽出物などの有効性が確認されている。また、樹状突起形成を抑制する物質としてアルブチンも知られている。

【0004】しかしながら、これらの物質は、メラニン生成抑制作用や樹状突起形成抑制作用が不十分で、ま

た、安全性、安定性に問題があるものもあり、色素沈着防止剤として使用するには必ずしも満足できるものではなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明の課題は、安定性、安全性およびメラニン生成抑制作用等のいずれにおいても優れ、従来のものよりも優れた色素沈着防止剤を提供することにある。

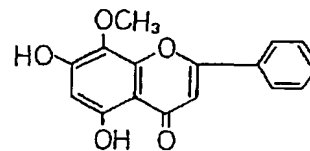
【0006】

- 10 【課題を解決するための手段】本発明者は、よりすぐれたメラニン生成抑制作用を有する物質について、天然物を中心に検索を行っていたところ、生薬オウゴンに含まれるオウゴンinがチロシナーゼ阻害作用、樹状突起形成抑制作用およびメラニン生成抑制作用を有することを見出した。そして更に、このものは安全性も高く、広く化粧料などに配合できることを確認し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は次の式 (I)

【化 2】

20



で表されるオウゴンinを有効成分として含有することを特徴とする色素沈着防止剤並びにこれを配合した皮膚化粧料および皮膚外用剤を提供するものである。

【0008】

- 30 【発明の実施の形態】本発明の色素沈着防止剤の有効成分であるオウゴンinは、日本薬局方に記載された生薬オウゴンに含まれるフラボノールで、生薬オウゴンより有機溶媒での抽出、濾過または遠心分離による固形物の除去、シリカゲルカラム、HPLC等のクロマトグラフィーによる精製で得られるものである。また、オウゴンin自体、既に試薬として市販されているのでこれを利用して良い。

- 40 【0009】本発明の色素沈着防止剤は、上記のオウゴンinを必要に応じて適切な担体と組み合わせることにより調製される。使用される担体としては、アルコール、植物油、ワセリン等が挙げられ、これに更に乳化剤等を添加してもよい。

【0010】本発明の色素沈着防止剤を添加し、美白作用を有する皮膚化粧料や皮膚外用剤を製造する場合は、常法による化粧料や外用剤製造の任意の段階で、本発明の色素沈着防止剤を適量添加すれば良い。色素沈着防止剤の添加量は、用いるオウゴンinの効果の強さや化粧料、外用剤の種類によって異なるが、多くの場合、オウゴンinとして0.0001~50重量%、望ましくは0.001~10重量%程度を添加することにより好結果を得ることができる。

【0011】本発明の皮膚化粧料の例としては、クリーム、乳液、化粧水、その他各種の油性化粧料、粉末化粧料、パック剤、浴用剤等が挙げられる。また、皮膚外用剤の例としては、軟膏剤、硬膏剤、液剤（酒精剤、チンキ剤、ローション剤等）、湿布剤（パップ剤、パスター剤）、リニメント剤、クリーム剤、乳剤等が挙げられる。

【0012】なお、本発明の皮膚化粧料を製造する場合、上記の色素沈着防止剤の他、化粧料製造に通常使用される非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤等の乳化剤；植物油、動物油、高級脂肪酸、高級アルコール、合成エステル油、ワックス類、シリコン油等の油性物質；水、香料、防腐剤、顔料、皮膚栄養剤、皮膚賦活剤、保湿剤、紫外線防止剤、pH調節剤等を、ほとんどの場合、そのまま使用することができ、基本的な化粧料処方の変更を必要とすることはない。

【0013】

【作用】本発明の色素沈着防止剤は、オウゴニンの有するチロシナーゼ阻害作用、樹状突起形成抑制作用およびメラニン生成抑制作用を利用して、メラニンの生成を阻害し、また、生成されたメラニンの表皮細胞への移動を阻害することにより、色素の沈着を総合的に防止するものである。

【0014】

【実施例】以下、実施例を示し、本発明を更に詳しく説*

$$(D-C) - (B-A)$$

$$\text{阻 害 率 (\%)} = \frac{(D-C) - (B-A)}{(D-C)} \times 100 \quad (1)$$

A： 試料を添加した場合のインキュベート前の吸光度

B： 試料を添加した場合のインキュベート後の吸光度

C： 試料を添加していない場合のインキュベート前の吸光度

※D： 試料を添加していない場合のインキュベート後の吸光度

【0018】

※ 【表1】

試 料	チロシナーゼ活性の阻害効果 (IC ₅₀ , μg/ml)
オウゴニン	195
コウジ酸	4
アルブチン	127

【0019】実施例 2

樹状突起形成抑制効果試験：マウス由来のB16メラノーマ培養細胞（B16-F1細胞、大日本製薬より購入）を、培養用6ウェルプレートの各ウェルに1×10⁵個分注し、10%牛胎児血清（ベーリンガーマンハイム社製）、ペニシリン（100U/ml）、ストレプトマイシン（100μg/ml）およびアンホテリシンB（0.25μg/ml）を含むダルベッコ変法MEM培地（以上、シグマケミカル社製）中、CO₂ インキュベーター（95%空気、5%CO₂）内、37℃条件下で

培養した。培養5時間後に牛胎児血清を含まない新鮮な上記培地に交換し、種々の濃度の試料（エタノール溶液）および対照のエタノール（最終濃度1%）を添加した。さらに19時間培養した後、位相差顕微鏡（オリンパス社製）で細胞の写真を撮り、樹状突起保有細胞（細胞の直径または短径より長い樹状突起をもつ細胞）の数を数え、樹状突起保有細胞数/総細胞数を求めた。なお、写真撮影後、トリプシン処理で集めた細胞の数をコールターカウンター（コールター社製）で測定し、細胞毒性のないことを確認した。結果は対照の測定値

*明するが、本発明はこれら実施例によりなんら制約されるものではない。

【0015】実施例 1

チロシナーゼ活性の阻害効果試験

オウゴニン（松浦薬業社製）と、比較対照のコウジ酸、（シグマケミカル社製）およびアルブチン（和光純薬社製）のチロシナーゼ活性の阻害効果、樹状突起形成の抑制効果およびメラニン生成の抑制効果を下記の試験方法で測定した。

【0016】（試験方法）96ウェルプレートの各ウェルに、蒸留水を25μl、マッシュルーム由来チロシナーゼを0.4M-HEPES緩衝液（pH6.8）に溶解した溶液（600単位/ml）を25μl、エタノールを50μl、および段階的濃度で調製した試料を取り、混合した。あらかじめ37℃でインキュベートしたHEPES緩衝液（pH6.8、0.4M）を12.5μl、L-チロシン溶液（2.5mM）を37.5μlを各ウェルに添加し、攪拌後、37℃で15分間インキュベートした。反応前後に475nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（Bio-Tek社製）で測定し、次式（1）によりチロシナーゼ阻害率を算出した。

チロシナーゼ活性の阻害効果は、算出された阻害率から更に50%阻害濃度（IC₅₀）を求め、この値で表した。この結果を表1に示す。

【0017】算出式：

を100とした時の数字で示した。この結果を表2に示す。

*【0020】

*【表2】

試料(濃度、 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		樹状突起保有細胞数/総細胞数
対 照	0.0	100 \pm 4
オウゴン	0.1	88 \pm 6
	0.3	77 \pm 3
	0.6	74 \pm 5
コウジ酸	14.2	84 \pm 5
	28.4	73 \pm 6
アルブチン	27.2	89 \pm 4
	54.4	86 \pm 1

数値は平均値 \pm 標準偏差(N=3)

【0021】実施例 3

メラニン生成抑制効果試験：マウス由来のB16メラノーマ培養細胞を、培養用6ウェルプレートの各ウェルに 1×10^6 個分注し、10%牛胎児血清、ペニシリン($100 \text{ U}/\text{ml}$)、ストレプトマイシン($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)およびアンホテリシンB($0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$)を含むダルベッコ変法MEM培地中、 CO_2 インキュベーター(95%空気、5% CO_2)内、37℃条件下で培養した。培養24時間後に新鮮な上記培地に交換し、種々の濃度の試料(エタノール溶液)および対照のエタノール(最終濃度1%)を添加した。さらに3日間培養し、以下の方法で細胞内メラニン量、総メラニン量、細胞のタンパク量を測定した。

【0022】(メラニン量、タンパク量の測定方法)

ウェルより培地を除去し、トリプシン処理、PBSによる洗浄、エタノールによる洗浄を行った後、風乾した細胞を1M-NaOH中、80℃で30分間、加熱溶解し※

※た。本溶液および同様に溶解した合成メラニン(シグマケミカル社製)溶液の475nm-660nmの吸光度より細胞内メラニン量を求めた。また、BCAプロテインアッセイキット(ピアース社製)を用い測定した本溶液のタンパク量より細胞のタンパク量を求めた。さらに、ウェルより除去した培地を遠心分離(700g、10分間、4℃)し、得られた上清に等量の10%エタノール含有0.36M-HEPES緩衝液(pH6.8)を加えpH調整した後、本溶液および同様にpH調整した合成メラニン溶液の475nm-660nmの吸光度より細胞外メラニン量を求めた。細胞内メラニン量および細胞外メラニン量の合計を総メラニン量とした。結果は対照の測定値を100とした数字で示した。この結果を表3に示す。

【0023】

【表3】

試料(濃度、 $\mu\text{g}/\text{ml}$)		細胞内メラニン量(%)	総メラニン量(%)	細胞のタンパク量(%)
対 照	0.0	100 \pm 6	100 \pm 2	100 \pm 4
オウゴン	0.1	96 \pm 5	97 \pm 5	100 \pm 3
	0.3	78 \pm 9	90 \pm 4	104 \pm 6
	0.6	61 \pm 7	85 \pm 5	95 \pm 7
	1.4	54 \pm 8	89 \pm 7	94 \pm 7
	7.1	97 \pm 6	88 \pm 8	98 \pm 3
コウジ酸	14.2	103 \pm 8	81 \pm 6	104 \pm 4
	28.4	95 \pm 5	88 \pm 2	106 \pm 8
アルブチン	27.2	66 \pm 7	75 \pm 6	109 \pm 12

数値は平均値 \pm 標準偏差(N=4~6)

【0024】以上のように、オウゴンに一応のチロシナーゼ活性の阻害効果が認められたが、その効果は比較対照のコウジ酸、アルブチンより低かった(実施例1)。一方、B16マウスメラノーマ培養細胞を用い測

定したオウゴンのメラニン生成抑制効果、およびメラニンの細胞外分泌に關与する樹状突起形成の抑制効果は、比較対照のコウジ酸、アルブチンより10倍以上高かった(実施例2および3)。

【0025】この結果から明らかなように、オウゴン
は、チロシナーゼ活性阻害作用においては、コウジ酸、
アルブチンに劣るが、メラニン生成抑制効果、およびメ
ラニンの細胞外分泌に関与する樹状突起形成の抑制効果
ではコウジ酸およびアルブチンに比べ優れており、総合*

オウゴン	0.5重量%
エタノール	10.0重量%
1,3-ブチレングリコール	2.0重量%
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(50E.O.)	0.05重量%
パラオキシ安息香酸メチル	0.1重量%
香料	0.1重量%
精製水	残部

【0027】得られた化粧水は美白作用に優れ、且つさ
っぱりした使用感のものであった。また、保存安定性も
良好であった。

※

オウゴン	1.0重量%
ステアリン酸	2.0重量%
流動パラフィン	6.0重量%
スクワラン	2.0重量%
ソルビタンモノステアレート	1.5重量%
ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート (20E.O.)	2.0重量%
パラオキシ安息香酸メチル	0.05重量%
1,3-ブチレングリコール	0.1重量%
香料	0.15重量%
精製水	残部

【0029】得られた乳液は美白作用にすぐれ、しっと
りした使用感のものであった。また保存安定性にもすぐ
れていた。

★

オウゴン	1.0重量%
流動パラフィン	23.0重量%
ワセリン	7.0重量%
ベヘニルアルコール	1.0重量%
ステアリン酸	2.0重量%
ミツロウ	2.0重量%
ソルビタンモノステアレート	1.5重量%
ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート (20E.O.)	2.5重量%
パラオキシ安息香酸ブチル	0.05重量%
1,3-ブチレングリコール	3.0重量%
パラオキシ安息香酸メチル	0.1重量%
香料	0.15重量%
精製水	残部

【0031】得られたクリームは美白作用に優れ、使用
感も良好であった。また保存安定性にも優れていた。 ☆

オウゴン
日本薬局方親水軟膏

【0033】本軟膏を一日2回シミの部位に塗布(2m
g/cm²)したところ、優れた美白作用が見られ、ま
た、保存安定性も良好であった。

*的な色素沈着防止効果では、オウゴンはアルブチン、
コウジ酸より優れていた。

【0026】実施例4

下記組成の化粧水を常法により製造した。

※【0028】実施例5

下記組成の乳液を常法により製造した。

★【0030】実施例6

下記組成のクリームを常法により製造した。

☆【0032】実施例7

下記組成の軟膏を常法により製造した。

5.0重量%
95.0重量%

【0034】

【発明の効果】オウゴンを有効成分とする本発明の色
素沈着防止剤は、メラニン生成抑制作用および樹状突起

形成抑制作用に基づく優れた美白作用を有する。また、生薬オウゴンが古くから服用されていたことから明らかなごとく、本発明の色素沈着防止剤は安全性に優れ、また、使用感および安定性にも優れているものである。従*

*って、この色素沈着防止剤は、これを美白効果を目的とする皮膚化粧料や皮膚外用剤の添加、配合成分として有利に利用することができるものである。
以 上

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

// A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

Q

(72) 発明者 市岡 稔

東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 19 号 株式会
社ヤクルト本社内

(72) 発明者 大脇 真

東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 19 号 株式会
社ヤクルト本社内